氏　　名	関屋　健史
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博乙第　２９２６　号
学位授与年月	令和元年５月３１日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	CTCF による G1 初期のクロマチン高次構造形成を介した *EGR1* の発現制御機構

主　　査	筑波大学教授	博士（生物科学）	村谷　匡史
副　　査	筑波大学准教授	博士（医学）	福田　綾
副　　査	筑波大学助教	博士（医学）	新開　泰弘
副　　査	筑波大学助教	博士（医学）	宮本　崇史

論文の内容の要旨

関屋健史氏の博士学位論文は、クロマチンの制御状態と遺伝子発現パターンが細胞周期を経て受け継がれる機構を研究し、インシュレーター因子 CTCF が *EGR1* 遺伝子座の G1 期初期におけるクロマチン高次構造の調節に関与することを明らかにしたものである。その要旨は以下のとおりである。

著者は、第一章において、転写制御を中心に、多段階で調節される遺伝子発現の制御機構を序論としてまとめている。最初に基本転写因子と RNA ポリメラーゼ、およびプロモーター配列との相互作用による転写の各段階について述べ、そこから細胞種に特異的な転写機構とエピジェネティックな制御、さらに、これらの制御において重要な役割を果たすクロマチン構造について、これまでの研究で明らかにされた背景が説明されている。これに続き、ヘテロクロマチンやエンハンサーの概念とともにインシュレーターを取り上げ、その機能を担う因子として CTCF について述べている。クロマチン高次構造の制御モデルと細胞周期の M 期に想定される Bookmarker 因子群についての研究背景から、本研究での仮説として M 期から G1 期にかけて起きる遺伝子制御状態の再構成における CTCF の関与を提示している。

次に著者は、第二章において、M 期における CTCF のリン酸化修飾の解析、およびリン酸化サイトの DNA 結合における機能を検討し、その結果を述べている。CTCF は 11 個の Zinc finger モチーフと 10 個のリンカードメインを持ち、特異的な DNA 配列を認識する。しかし、一部のリンカードメインを除いて、CTCF のリン酸化状態と DNA 結合への影響、さらに細胞周期の各段階におけるリン酸化状態については明らか

になっていなかった。そこで著者は、HeLa S3 細胞と MCF-7 細胞をモデル系として用い、チミジン・ブロック法とノコダゾール・ブロック法によって得た M 期細胞と非同調の細胞における CTCF リン酸化状態を Phos-tag SDS-PAGE 法、本研究で作製したリン酸化特異的抗体、リン酸化サイト変異型 CTCF 発現系の組み合わせにより検討している。これらの結果から、著者は、CTCF のリンカードメインは M 期に高度にリン酸化されていること、それらの部位が 8 カ所に（T289、T317、T346、T374、S402、T431、S461、T518）に存在すことを明らかにした。また、M 期細胞から精製した CTCF、フォスファターゼ処理、リン酸化サイト変異型 CTCF を用いた DNA 結合アッセイにより、M 期に亢進するリン酸化は CTCF の DNA 結合活性を阻害することを示した。

第三章において、著者は、G1 期初期に活性化される遺伝子群の探索から *EGR1* 遺伝子を見出し、その遺伝子座と発現制御における CTCF の機能を検討している。shRNA ベクター系を用いた CTCF のノックダウン実験では、*EGR1* pre-mRNA 量の G1 初期における増加がノックダウン細胞では抑制されることが示された。しかし、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子系を用いた解析ではこの効果は見られなかった。このことから、CTCF は *EGR1* 遺伝子をクロマチン環境に依存して制御していることが示唆された。クロマチン免疫沈降アッセイにより、*EGR1* 遺伝子の上流、下流とプロモーター領域への CTCF 結合が G1 初期に確認された。M 期において CTCF はこれらの部位に結合しておらず、CTCF 以外のエピジェネティックな機構による Bookmarking が示唆された。これらの結果をもとに 3C 法によるクロマチン高次構造の解析を進めた結果、CTCF に依存して G1 初期の *EGR1* 遺伝子の上流と下流の DNA 領域の会合が起きることが示された。さらに、dCas9/gRNA による CTCF 結合阻害実験により、このクロマチン構造変化が CTCF のクロマチンへの結合に依存していることも明らかにした。

最後に著者は、第四章において、以上の結果を総括するとともに、CTCF による *EGR1* 遺伝子座における G1 初期のクロマチン構造制御について、M 期に乖離する CTCF と DNA メチル化やヒストン修飾等のエピジェネティックな機構の協調により、M 期から G1 初期にクロマチンの高次構造の再構成が速やかに行われるモデルを示している。

審査の結果の要旨

（批評）

著者は本研究において、細胞周期特異的な CTCF のリン酸化状態の解析を通して、修飾部位の特定と DNA 結合への影響をタンパク質レベルで明らかにした。さらに、*EGR1* 座位をモデルとして、RNA 発現、クロマチン免疫沈降アッセイ、3C 法および dCas9/gRNA の実験系を構築して統合的に評価することで、CTCF の果たす G1 初期のクロマチンの高次構造制御と転写調節における役割を示した。転写因子 CTCF の分子レベルでの解析結果に加え、クロマチン構造の空間的制御に関する解析まで多岐にわたる実験を行うことで、CTCF 自身の機能調節機構を標的座位に直接結びつけて、その機能的意義を慎重に検証した点は高く評価できる。

平成 31 年 3 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

なお、学力の確認は、人間総合科学研究科学位論文審査等実施細則第 11 条を適用し免除とした。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。